

2023年11月22日

新潟大学

1 型糖尿病における歯髄創傷遅延のメカニズムを解明 － 糖尿病モデルラットを用いた免疫組織学的解析 －

新潟大学大学院医歯学総合研究科う蝕学分野の大学院生 Rosa Baldeon（博士課程3年）、大倉直人助教、野杵由一郎教授らの研究グループは、1型糖尿病モデルラットに直接覆髄処置（注1）を行い、その治癒過程について免疫組織学的手法を用いて解析を行いました。組織修復には間葉系幹細胞（注2）が修復に必要な細胞へ分化（注3）する必要があり、歯髄創傷治癒時では象牙芽細胞様細胞（注4）への分化が必要ですが、この分化過程が糖尿病モデルラットでは遅延していることを明らかにしました。さらに高血糖状態のため、修復に関与するM2マクロファージ（注5）の創傷部への集積が困難な状態である可能性が高いことを確認しました。

本研究成果は、2023年11月7日、科学誌「Journal of Endodontics」のオンライン版に掲載されました。

【本研究成果のポイント】

- 1型糖尿病モデルラット（DM1）では、歯髄創傷治癒が遅延することを確認した。
- DM1の治癒が遅延する原因として、間葉系幹細胞から象牙芽細胞様細胞への分化が遅延していることに加え、修復に関与するM2マクロファージの創傷部への集積が阻害されていることを確認した。

1. 研究の背景

1型糖尿病は、小児期の最も一般的な慢性疾患の1つであり、持続的な高血糖によって様々な慢性的合併症を引き起こします（Katsura A et al, 2017）。糖尿病によるインスリン抵抗性と高血糖は、歯周炎、う蝕（むし歯）や癌などの口腔疾患を発症する可能性があります（Saghiri M et al, 2021）。糖尿病患者さんは、炎症になりやすいため、歯髄（シンケイと呼ばれる歯の内部組織）への炎症も波及しやすいとされています（Gonzalez Y et al, 2022）。実際、1型糖尿病に関する高いう蝕有病率は、エナメル質および象牙質表面の厚さの減少と唾液流料の減少によって引き起こされる可能性が指摘されています（Yeh CK A et al, 2012）。

歯髄にはもともと高い治癒能力があるため、可能な限り歯科医師は、歯髄の保存に努めます。

しかし、糖尿病患者さんは全身循環障害による創傷部位への血液供給不足により創傷治癒が遅れてしまうため、歯髄保存が難しいとされています。この原因を突き止めることができれば、糖尿病患者に適したむし歯治療が提供できるのではないかと考え、研究を進めました。

II. 研究の概要・成果

本研究グループは最初に、ストレプトゾトシンを決められた量ラットのお腹に注射することで、1型糖尿病のモデルラットを作製しました。糖尿病に罹患したラットに対して直接覆髄処置を図1のように行い、処置後7日目の歯髄の病態を観察しました。

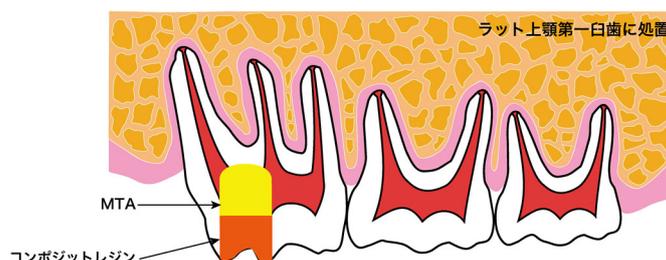


図1. ラットへの覆髄処置

ラットの上顎第一臼歯という場所に、顕微鏡下で小さなドリルを使って穴を開け、そこにMTA (mineral trioxide aggregate) と呼ばれる覆髄剤を塗布し、さらにその上からコンポジットレジンと呼ばれるとても硬いプラスチックを詰めます。この処置は、臨床で患者さんに行っている治療と同じものです。

野生型のラットでは直接覆髄後7日目で、創傷部直下において修復象牙質（注6）の形成を認めたことから、創傷治癒が完了していることを確認しました（図2）。一方で、1型糖尿病モデルラットでは、大量の肉芽組織や壊死組織が観察され、修復象牙質の形成はあまり認められませんでした。

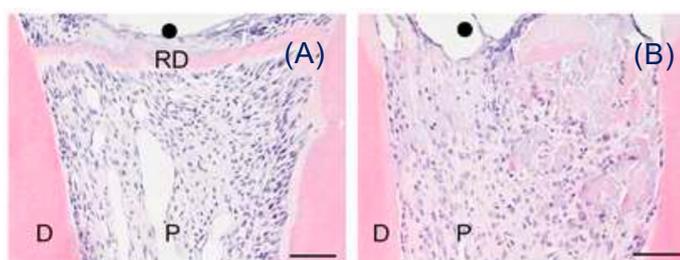


図2. 組織学的解析

A. 野生型、B. 1型糖尿病モデルラット

1型糖尿病モデルラットの方では修復象牙質層を認めなかった。

RD: 修復象牙質、D: 象牙質、P: 歯髄、●壊死層、バーは100 μ m。

この知見は、修復象牙質を形成する能力に差があるためと仮定し、次に細胞分化とマトリックスの石灰化に関連するオステオポンチンと、修復象牙質を形成する象牙が細胞様細胞のマーカーである Nestin に対する特異的抗体を用いて免疫組織学的手法を行いました。その結果、オステオポンチンは野生型ラットと1型糖尿病モデルラットの両方のグループの創傷部直下で発現していました。一方で Nestin は、野生型ラットでは修復象牙質直下で認め、1型糖尿

病モデルラットでは壊死層直下で陽性反応を認めました。以上のことから、病理組織学的差異から、1型糖尿病モデルラットでは創傷治癒が遅延していることを突き止めました。

創傷治癒の遅延の原因は、1型糖尿病モデルラットでは歯髓幹細胞から象牙芽細胞様細胞への分化が遅れ、その結果、修復象牙質形成も遅延しているのではないかと仮説を立てました。そこで、歯髓幹細胞が直接覆髓後7日目で象牙芽細胞様細胞へ分化可能であるかどうかを確認するために、両グループ間の α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性細胞の局在について免疫組織学的解析を行いました。 α -SMA 陽性細胞は未熟な象牙芽細胞様細胞には局在しますが、成熟すると消失することをこれまでに報告しています (Yoshida N et al, 2012)。その結果、1型糖尿病モデルラットでは、 α -SMA 陽性細胞が壊死層の下に局在しており、この陽性細胞数は野生型と比較して有意に増加していました。

本研究グループは、以前、Nestin が成熟した象牙芽細胞様細胞と未熟な象牙芽細胞様細胞の両方を、歯髓創傷治癒の初期で発現してくることを報告しています (Ohkura N et al, 2023)。そこで、本研究グループはこの知見を元に、 α -SMA 陽性細胞が未熟な象牙芽細胞様細胞なのか成熟したものなのかを解析するために、Nestin と α -SMA による二重蛍光免疫染色法による局在解析を行いました。その結果、野生型と1型糖尿病モデルラットともに二重陽性細胞が損傷部位の直下で観察されました(図3)。しかし、1型糖尿病モデルラットでは野生型と比較して二重陽性細胞数が著明に増加しており、このことから、未熟な象牙芽細胞様細胞が多いことが明らかになりました。

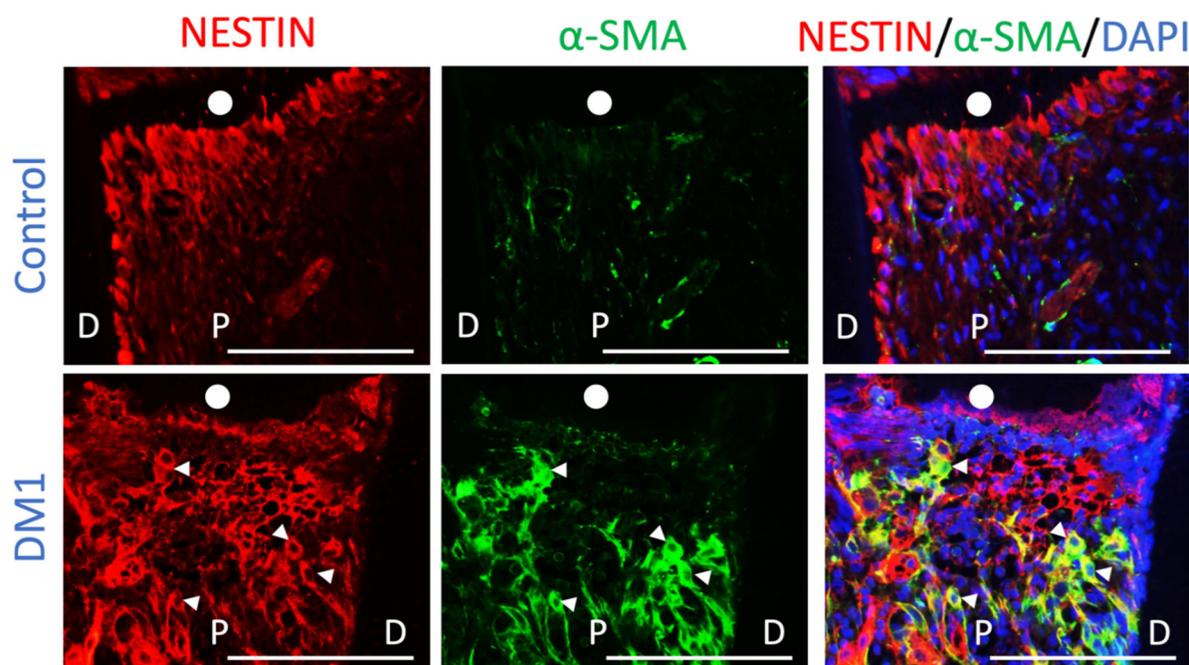


図3. Nestin と α -SMA との二重免疫染色

赤: Nestin、緑: α -SMA、青: 核。CG: 野生型ラット、DM1: 1型糖尿病モデルラット。

直接覆髓後7日目の創傷部直下では、野生型と比較して1型糖尿病モデルラットでは二重陽性細胞が増加していることを明らかにした。バーは100 μ m。●修復象牙質あるいは壊死層。P: 歯髓、D: 象牙質。矢頭は二重陽性細胞を示している。

以上のことから1型糖尿病モデルラットでは直接覆髄後の歯髄で治癒障害が起こっていることがわかり、次に、この治癒障害にマクロファージが関与していると仮定し研究を進めました。マクロファージは、炎症促進機能を有するM1マクロファージと治癒促進機能を有するM2マクロファージの間で、周囲の環境に応じて変化する（分極する）、すなわち炎症初期ではM1マクロファージが多いですが、炎症後期（修復期）ではM2マクロファージが多く存在していることがわかっています（Mantovani A et al, 2013）。そこで、本研究グループはM1/M2マクロファージを同定するための免疫二重蛍光染色を行い、創傷治癒部で展開している各マクロファージの分極の割合を調査しました。その結果、野生型と比較して1型糖尿病モデルラットではM1マクロファージが増加する一方で、M2マクロファージは減少していることを見出しました（図4）。これらの知見が意味することは、以下の2つのこととなります。①M2マクロファージが1型糖尿病モデルラットで減少していたため、治癒傾向ではないことが示唆されました。②さらにM1マクロファージが存在し続けていることが、象牙芽細胞様細胞への成熟を阻害している可能性が考えられます。

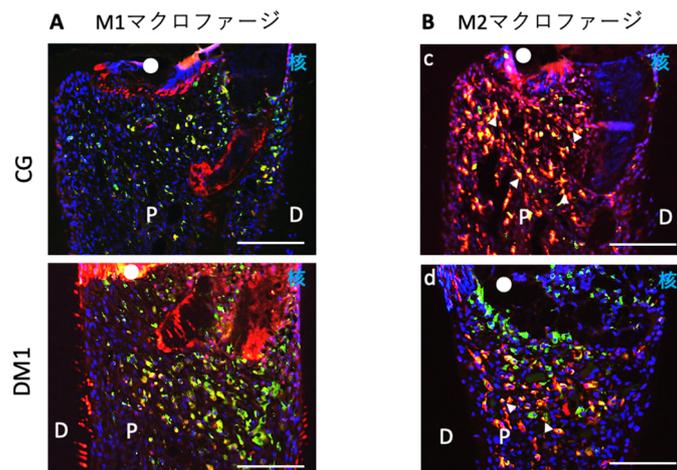


図4. M1マクロファージとM2マクロファージの局在解析
 黄色：M1マクロファージあるいはM2マクロファージ、青：核。CG：野生型ラット、DM1：1型糖尿病モデルラット。●修復象牙質あるいは壊死層。P：歯髄、D：象牙質。
 直接覆髄後7日目の創傷部直下では、M1マクロファージが増加し、M2マクロファージが減少していた。バーは100 μ m。

III. 今後の展開

糖尿病には1型だけでなく2型も存在しており、両方とも炎症が治まりにくいとされています。今回はモデル動物を用いた1型糖尿病のみの結果ですが、2型糖尿病での病態がどのように変化しているのかを解析することにより、糖尿病時の病態情報がさらにわかるようになると考えられます。今後は、2型糖尿病モデルについても調査をしていく予定です。

IV. 研究成果の公表

本研究成果は、2023年11月7日、科学誌「Journal of Endodontics」のオンライン版に掲

載されました。

論文タイトル：Wound healing processes after pulpotomy in the pulp tissue of type 1 diabetes mellitus model rats

著者：Rosa Baldeon-Gutierrez¹⁾, Naoto Ohkura¹⁾, Kunihiro Yoshiba²⁾, Nagako Yoshiba¹⁾, Aiko Tohma¹⁾, Ryosuke Takeuchi¹⁾, Razi Saifullah Ibun Belal¹⁾, Naoki Edanami¹⁾, Shintaro Takahara¹⁾, Susan Gomez-Kasimoto¹⁾, Takako Ida¹⁾, Yuichiro Noiri¹⁾

doi: 10.1016/j.joen.2023.10.016

- 1) Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata Japan.
- 2) Division of Oral Science for Health Promotion, Department of Oral Health and Welfare, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata Japan.

V. 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費助成事業（19K10147、21H03117、21K09914）の支援を受けて行われました。

【用語解説】

（注 1）直接覆髄処置・・・むし歯の除去中に神経が露出した場合に行われる治療法で、神経を特殊な薬剤で直接覆い、神経を保護します。

（注 2）間葉系幹細胞・・・私たちの体に自然に備わっている幹細胞の1つで、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞など様々な細胞に分化できると言われています。

（注 3）分化・・・細胞が特定の機能をもつ細胞に変化すること。

（注 4）象牙芽細胞様細胞・・・象牙芽細胞（象牙質と呼ばれる歯を作り出す細胞）の細胞死をきっかけに、歯髄（神経と呼ばれる部分）の中にある細胞がこの象牙芽細胞に変化した細胞を指します。

（注 5）M2 マクロファージ・・・慢性炎症に関わるマクロファージの状態で、創傷治癒を促進します。

（注 6）修復象牙質・・・かむことですり減ったりして象牙質が失われた際に作られる象牙質のこと。

本件に関するお問い合わせ先

新潟大学大学院医歯学総合研究科（歯学部）

新潟大学医歯学総合病院 歯の診療科

助教 大倉 直人（おおくら なおと）

教授 野杵 由一郎（のいり ゆういちろう）

E-mail : ohkura@dent.niigata-u.ac.jp